Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HOMOIOPLASTISCHEN, IN CIALIT KONSERVIERTEN GEHÖRKNÖCHELCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas F. Berger
aus Stuttgart

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0032

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HOMOIOPLASTISCHEN, IN CIALIT KONSERVIERTEN GEHÖRKNÖCHELCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas F. Berger
aus Stuttgart

1978

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister

Berichterstatter: Professor Dr. D. Plester

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOFORTDRUCK H. G. VOGLER TÜBINGEN

In Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

A.) Geschichtlicher Überblick
Die Tympanoplastik 1
Auswahl des Transplantatmaterials 3
Konservierungsmethoden 5
Cialit als Konservierungsmittel 6
Cialit als Konservierungsmedium in der Mittelohrchirurgie 9
Anwendung des Cialit in der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Tübingen 11
Bakteriologische Untersuchungen 12

B.) Material 14

C.) Methoden
I.) Überprüfung der von Leichen entnommenen Gehörknöchelchen auf ihren Gehalt an Keimen
1.) Präparation der Gehörknöchelchen 16
2.) Überprüfung der Gehörknöchelchen auf Kontamination mit Primärkeimen
a.) Vorbereitungen und Vorversuche 16
b.) Anlage der Bakterienkulturen 18
c.) Differenzierung der Keime 19

II.) Überprüfung des Keimgehalts und -wachstums in Gehörknöchelchen nach Konservierung in Cialit
1.) Aufbereitung der Konservierungslösungen 24
2.) Eingabe der Knochen in die Cialitlösung 24
3.) Probenentnahme 24

III.) Überprüfung der Konservierung intraoperativ entnommener, entzündlicher Gehörknöchelchen
1.) Auswahl und Präparation der Gehörknöchelchen 25
2.) Konservierung der Operationspräparate 26

IV.) Feststellung des Keimgehalts in den Cialit-
lösungen selbst mittels Membranfiltersystems 26

V.) Kontrolle der bakteriziden Wirksamkeit
des Cialit 27

VI.) Überprüfung der Sterilität der Arbeits-
bedingungen 27
1.) Geräte 27
2.) Konservierungsmedien 28
3.) Nährmedien 28
4.) Laborluft 28

D.) Ergebnisse

Untersuchtes Leichenmaterial 29
Kontrolle der Cialitwirksamkeit auf Bakterien 30
Kontrolle der Arbeitsgeräte und -reagentien
auf Verunreinigung 32
Untersuchtes Operationsmaterial 32

E.) Diskussion der Ergebnisse

Leichenmaterial 35
Operationsmaterial 36

F.) Zusammenfassung 38

G.) Literaturverzeichnis 40

A.) Geschichtlicher Überblick

Die Tympanoplastik

In der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde nimmt die Mittelohrchirurgie eine bedeutende Rolle ein. Ihre Aufgabe ist es, krankhafte Mittelohrprozesse zur Heilung zu bringen. Erkrankungen im Mittelohr führen meist zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Hörverschlechterung hin, die es zu beseitigen oder zumindest zu lindern gilt.

Da neben dem Sehvermögen die Hörfähigkeit das wichtigste Mittel des Menschen ist, an seiner Umwelt teilzunehmen, führt eine Erkrankung des Ohres - und damit eine Schwerhörigkeit oder gar Ertaubung - zur Isolation des Patienten. Da kein anderes Sinnesorgan ein ausgefallenes Gehör in seiner Funktion ersetzen kann, wird sich der Patient von der Teilnahme am Gemeinschaftsleben ausgeschlossen finden. Ihm die Hörfähigkeit, und sei es auch nur zum Teil, wiederzugeben, muß das Anliegen des Otologen sein, der die Erkrankung des Ohres als Ursache der Ertaubung beseitigen will.

Nach Mittelohrprozessen ist oft ein restaurierender Eingriff des Schalleitungsapparates indiziert, da die Erkrankung die Schalleitungskette meist so in Mitleidenschaft gezogen hat, daß sie in ihrer Funktion als Übertragungs- und Verstärkungseinheit gestört ist. Das Ziel eines solchen Eingriffs ist der Ersatz sowohl zerstörter, funktionsunfähiger Kettenglieder, als auch noch nicht zerstörter, benachbarter Teile, die vor allem bei Cholesteatomeiterung durch die Rezidivgefahr bedroht sind. (BOENNINGHAUS[4])

Die bei einem solchen chirurgischen Eingriff angewandte Tympanoplastik wird von WULLSTEIN[58]) je nach Schwere des Defekts und Umfang des Eingriffs nach verschiedenen Typen

unterschieden. Im Jahre 1953 verwandte WULLSTEIN[57)] erstmalig den Begriff "Tympanoplastik". Er verstand hierunter eine Vielzahl operationstechnischer Massnahmen zur Besserung oder zur Wiederherstellung des Hörvermögens bei allen Formen der nicht otosklerotischen Schalleitungsschwerhörigkeit, vor allem bei der chronischen Otitis media. Er entwarf 5 Typen der Tympanoplastik, die es erlauben, bei ... Zerstörung ... ein funktionsfähiges Mittelohr wiederaufzubauen (PLESTER[45]).

Folgende 5 Typen der Tympanoplastik werden unterschieden:

Typ I : Plastische Abdeckung eines Trommelfelldefektes bei erhaltener, schwingungsfähiger Gehörknöchelchenkette.

Typ II : Bei teilweise defekter Gehörknöchelchenkette Wiederaufbau der Kette mit Knochenteilen, Knorpel, Draht oder Kunststoff.

Typ III : Die direkte Übertragung des Schalldrucks auf den Steigbügel ohne Hammer und Amboß (Columellaeffekt).

Typ IV : Keine Schalldruckübertragung durch Gehörknöchelchen, sie dient dem Schallschutz des runden Fensters, um eine Druckdifferenz des Schalls, der gleichzeitig ovales und rundes Fenster treffen würde, zu erreichen.

Typ V : Bei Mißbildungen im Bereich des ovalen Fensters oder unlösbar fixierter Steigbügelfußplatte (z.B. durch Narben). Anlegen eines Fensters im horizontalen Bogengang, abdecken von Fenster und Pauke mit freiem Fascientransplantat oder Gehörgangshautlappen.

Bei Typ I bis III kann die Schalleitungskomponente der Schwerhörigkeit postoperativ völlig verschwinden (BOENNINGHAUS[4]).

Auswahl des Transplantatmaterials

Vor allem bei der Tympanoplastik vom Typ II werden bevorzugt Knochentransplantate zum Aufbau der Kette verwendet. Unter einer Transplantation versteht man die Übertragung von ortsfremdem Gewebe oder anderem Material zur Deckung eines Gewebedefekts. Hier bieten sich verschiedene Arten der Plastik an, die nach der Art der Herkunft bezeichnet werden (PSCHYREMBEL[50]):

Das Isotransplantat wird zwischen Individuen derselben genetischen Abstammung (eineiige Zwillinge) übertragen.

Ein Autotransplantat ersetzt einen Defekt durch körpereigenes Gewebe; der Spender ist hier zugleich auch der Empfänger.

Unter einer Homoio- oder Homotransplantation versteht man die Gewebs- oder Organverpflanzung von einem Individuum auf ein anderes derselben Art.

Als Heterotransplantat wird Gewebe zwischen Individuen verschiedener Spezies übertragen (z.B. von Tier auf Mensch).

Die Allotransplantation ist der Ersatz eines Organs oder Organteils durch körperfremde Stoffe wie Metalle oder Kunststoffe.

FALKENTHAL[12)] verglich diese unterschiedlichen Materialien in Bezug auf ihren klinischen Wert.

Alloplastiken, die ihren Einzug vor allem in der Herzchirurgie gefunden haben, bringen Schwierigkeiten bei der Befestigung des Implantats mit sich, da sich keine organische Verbindung zwischen Empfängergewebe und Fremdmaterial bilden kann. Viele Otochirurgen lehnen deshalb das Allotransplantat bei der Tympanoplastik ab, da die klinischen Ergebnisse langfristig nicht befriedigend sind.

Auch die klinische Verwendung von heterologen Transplantaten brachten bisher nicht den gewünschten Erfolg.

SAEGESSER[51)] beschreibt die operativen Erfolge von heterologem Aortenklappenersatz als unbefriedigend: "Die endgültige Beurteilung ... bleibt vorläufig noch offen". Tierexperimentelle Studien mit denaturierten, heterologen Transplantaten, die von HILDMANN und STEINBACH[23)] durchgeführt wurden, zeigten, daß vom Menschen entnommene Fascie beim Kaninchen reaktionslos einheilt.

Selbst Autotransplantationen bringen schwerwiegende Nachteile mit sich. Zum einen muß der Patient eine zusätzliche Operation, nämlich die der Gewebsentnahme, über sich ergehen lassen. Dies hat weitere Komplikationsmöglichkeiten wie intraoperative Entzündungsgefahr und Narkoserisiko zur Folge. Auch muß die Diskussion um die Indikation eines solchen Eingriffs die seelische Belastung des Patienten berücksichtigen.

Die Otologen BURIAN und CANCURA[8)] weisen in ihren tierexperimentellen Untersuchungen auf die Gefahr der Cholesteatombildung hin, die besonders bei frischen Autotransplantaten durch "überschiessende Epithelproliferation" gegeben ist. Diese Untersuchungen bezogen sich auf frische, autologe Hautplastiken.

Einen Spender für eine Isoplastik zu finden, dürfte in den seltensten Fällen möglich sein, weshalb diese Transplantationsmethode in der Mittelohrchirurgie ausscheiden muß.

Bei chirurgischen Eingriffen am Mittelohr finden neben autologen hauptsächlich homologe Transplantate Verwendung. Da mit Antikörperreaktionen des Wirtsorganismus gegenüber einem frischen, homologen Implantat gerechnet werden muß, wird das homoioplastische Gewebe vor der Verpflanzung konserviert. Zahlreiche Erfahrungen PLESTER's[46,47)] bewiesen die Eignung homologer Trommelfelle und Knochentransplantate für die Wiederherstellung der Schalldrucktransformation im Mittelohr.

Vor der Beschaffung der Homoiotransplantate stellt sich die Frage, welche Anforderungen an die Spender zu stellen sind. Die Entnahme hat 24 Stunden postmortal (STEINBACH und WEBER[55]) bis 36 Stunden nach dem Tode (SCHMELZLE[52]) zu erfolgen. HAUBERG und BRUCKSCHEN[20], die Amputationsmaterial und keine Leichenknochen verwendeten, schließen Spender mit Verdacht auf Tuberkulose oder Tumoren aus. SMITH and OVERTON[54] verwenden keine Transplantate, deren Spender an malignen Tumoren, Hepatitis, Syphilis oder anderen Infektionen erkrankt waren. HOUSE, PATTERSON and LINTHICUM[27] berücksichtigen bei der Wahl ihrer Spender keine Patienten mit positivem serologischem Befund, infektiöser Hepatitis, Tumorverdacht oder akuten Entzündungen. LERCH[36] fordert vom Spender eine negative Wassermannreaktion, keine Tuberkulose, keine malignen Geschwülste, keine entzündlichen Reaktionen. STEINBACH und WEBER[55] entnehmen lediglich keine Leichengehörknöchelchen, deren Träger an Tuberkulose erkrankt waren. Weitere Einschränkungen werden in der Literatur nicht gemacht. HAUBERG und BRUCKSCHEN[20] halten die Blutgruppenübereinstimmung von Spender und Empfänger nicht für notwendig, da das Präparat durch die Konservierung inaktiviert würde. Von MARQUET[39] werden auch Alter und Geschlecht des Spenders für bedeutungslos gehalten.

Konservierungsmethoden

Da frisch vom Spender entnommenes Material nicht ohne weiteres sofort verpflanzt werden kann, stellt sich die Frage nach einer Maßnahme, die das Transplantat immunologisch tolerabel erscheinen läßt, es dabei aber auch vital erhält. Das Ziel der Konservierung wird von BETOW[3] als die Bewahrung des Gewebes vor der Zersetzung beschrieben, wobei das Transplantat nicht zu stark verändert werden soll. Erstrebenswert ist dabei jedoch der Verlust der antigenen Eigen-

schaften. Man unterscheidet eine Konservierung unter Erhalt der Vitalität des Gewebes von einer Konservierung, bei der das Transplantatgewebe durch Anwendung von Kälte oder chemischer Mittel abstirbt.

Zur Konservierung wurden die verschiedensten Maßnahmen entwickelt. Es bieten sich physikalische Methoden wie Lyophilisieren, Gefriertrocknen, Einfrieren, Kochen, Autoklavieren oder Behandlung mit chemischen Medien wie Alkohol, Antiseptika oder Formalin an. VAN DEN BROEK and KUIJPERS[5)] vergleichen die Konservierung mit verschiedenen Mitteln unter dem Hinblick auf die osteogenetische Potenz und das Antigenverhalten der Transplantate. Die Aufbewahrung unter Cialit (organische Quecksilberverbindung, Anm. d. Verf.), Einfrieren, Lagerung in Alkohol konserviert in verschiedenem Maße die osteogenetische Potenz. Sie wird jedoch durch Formalin oder Kochen völlig destruiert. Die Antigenreaktion wird durch Kochen, Cialit- bzw. Alkohollagerung beseitigt, durch Formalinbehandlung, Einfrieren oder Lyophilisieren zum Teil bewahrt.

Cialit als Konservierungsmittel

In den chirurgischen Abteilungen der Tübinger Universitätskliniken, in denen Transplantationen vorgenommen werden, wird zur Gewebskonservierung bevorzugt ein quecksilberorganisches Konservierungsmedium verwendet.

Die ASID GmbH, München, die das von der HOECHST AG, Frankfurt hergestellte Mittel vertreibt, beschreibt das 2 - (aethylmercurimercapto) - benzoxazol - 5 - carbonsaure Natrium als ein fast weißes Pulver, das beim Erhitzen, ohne zu schmelzen, verkohlt. Es ist in Wasser und Methanol leicht löslich, schwerer in Aethylalkohol und unlöslich in Äther und Aceton.

Bereits 1933 wurden von GRÜTER[13] Desinfektionsversuche mit diesem Mittel angestellt, die recht befriedigende Ergebnisse erbrachten. HAUBERG und BRUCKSCHEN[20] untersuchten 1954 die Möglichkeit der Knochenkonservierung und beurteilten diese Methode als praktikabel. Zu einem ähnlich günstigen Urteil über das Konservierungsmedium Cialit kamen in ihren Untersuchungen auch LENTZ[35] 1954, BRUCKSCHEN [6,7], GÜNTZ[15] 1956 und LERCH[37] 1957, der Kalbsknochen zur Konservierung in Cialit gelagert hatte. BRUCKSCHEN[6] berichtete über einen Fall von Kniegelenkstuberkulose eines 15-jährigen Patienten. Der daumennagelgroße Eiterherd sei ausgeräumt, mit einer Cialitlösung in der Verdünnung 1 : 5 000 ausgespült und mit konserviertem Knochenspanmaterial ausgefüllt worden. Die Späne seien reaktionslos eingeheilt, obwohl die bakteriologische Untersuchung des Eiters eine hochaktive Tuberkulose ergeben habe.

In seinen jüngeren Untersuchungen beschreibt JÄGER[28] 1970 die Eigenschaften des Cialit, seine optische Stabilität, gleichzeitige Konservierung und Sterilisierung eines Gewebes und einfache und billige Handhabung, stellt jedoch die Sicherheit der Sterilhaltung in Frage. In vergleichenden Experimenten an zwei quecksilberhaltigen Konservierungsmedien zur Frage der Transplantabilität von Knorpel erwähnt auch LANGNICKEL[34] 1972 Cialit als gutes bakterizides Konservierungsmittel.

MARQUET[40] fordert in seinen Untersuchungen 1968 bei der Wahl des Konservierungsmittels: "the criteria ... in the choice of means of preservation are:

1st Guarantee of preservation of the fibrous structure of the tissues

2nd Guarantee of preservation absolute sterility of the utilized graft ...

3rd ... procedure ... simple enough to be easily used in the clinic".

Diese Ansprüche sieht MARQUET von einer 1 zu 5 000 verdünnten, wässrigen Lösung eines Natriumsalzes einer quecksilberorganischen Verbindung (Cialit, Anm. d. Verf.) erfüllt.

1956 stellte HOEGEN[26] eine Wertigkeitsskala verschieden konservierter Transplantate auf, die er histologisch untersucht hatte. Diese Skala wird von frischen Autoplastiken angeführt, gefolgt von tiefgekühlten und gekochten autologen Transplantaten. Am ungünstigsten beurteilte er das Cialitkonservierte Homoiotransplantat. Dieser kritischen Ansicht gegenüber Cialit schlossen sich auch MAATZ[38] und HACKETHAL[18] an, die beide den kältekonservierten Knochenspan vorziehen.

CHRISTIANSEN and HOHMANN[9] untersuchten Konservierungsmethoden an homologen Amboßtransplantaten von Katzen und kamen zu dem Schluß, "... bones preserved in Cialit and alcohol were replaced much faster and ossicular chain fixation occurred, the incus bones preserved by freezing were better tolerated than the Cialit and alcohol ones, but not as well as the formalin ones".

Da Cialit, wie oben erwähnt, als trockenes Pulver im Handel ist, muß es vor seiner Verwendung als Konservierungsmedium in einen gebrauchsfertigen Zustand d.h. in Lösung gebracht werden. Nach Angabe des Lieferanten ist es gut wasserlöslich, es ist jedoch darauf zu achten, daß bidestilliertes Wasser verwendet wird, um eine Ausfällung zu vermeiden. In Lösungen 1 : 1 000 und 1 : 500 treten weder Rückstände noch Niederschläge auf. Um eine Verdünnung von 1 : 1 000 zu erhalten, müssen in 1 000 ccm Aqua bidestillata 1 g des Cialitpulvers gelöst werden.

In der Literatur werden verschiedene Angaben zur Konzen-

tration gemacht:

EVERSHEIM, HELMS und STEINBACH[11] unternahmen Tierexperimente mit einer Cialitkonzentration von 1 : 1 000. GRÜTER[13] verwendete für seine Desinfektionsversuche Verdünnungen von 1 : 1 000, 1 : 5 000, 1 : 10 000 und 1 : 20 000. HALLMANN's[19] Angaben über Cialit bezogen sich auf eine Konzentration von 1 : 2 500. LERCH[37] verdünnte das Cialit im Verhältnis 1 : 3 000.

Die meisten Untersuchungen und Experimente wurden jedoch mit einer Konzentration von 1 : 5 000 vorgenommen, bei der nach HAUBERG und BRUCKSCHEN[20] keine toxischen Wirkungen beobachtet werden konnten.

Cialit als Konservierungsmedium in der Mittelohrchirurgie

Fortschritte und neue Erkenntnisse in der Mikrochirurgie des Ohres führten in den letzten 14 Jahren zu einer Verfeinerung und Vervollkommnung der Techniken, die von PLESTER[45] an Hand denaturierter Homoiotransplantate des Trommelfells beschrieben wurden. Große Beachtung fand 1966 MARQUET[39] der eine neue Technik der Myringoplastik, Trommelfelle zu verpflanzen, beschrieben hatte. Er erwähnte Cialit erstmals in der Otochirurgie, das er zur konservierenden Aufbewahrung seiner Trommelfelle benutzte.

Inzwischen wird Cialit als Konservierungsmittel von vielen Otologen verwendet, die eine Reihe klinischer und experimenteller Untersuchungen über das Verhalten von Cialit im Transplantat und im Wirtsorganismus angestellt haben.

So berichtete PLESTER[48] über seine Erfahrungen mit Transplantationen im Mittelohr, daß sich frische, nicht denaturierte autologe Fascie und konservierte, also denaturierte Gehörknöchelchen hervorragend für eine Transplan-

tation im Mittelohr eignen. Eine Knochentransplantation mit Cialitkonservierten Ossikula sei vor allem dann indiziert, wenn mit Bedeckung der Gehörknöchelchen durch Epithel gerechnet werden muß, wie es bei der Cholesteatombildung gelegentlich der Fall ist.

HILDMANN und STEINBACH[23] erwähnten in ihren Studien die gute Verträglichkeit von konservierten Fascientransplantaten, histologische Untersuchungen an homoioplastischen Incus-Transplantaten durch DATI[10] ergaben ferner, daß das Cialitkonservierte Transplantat vom Wirtsorganismus ohne immunologische und entzündliche Abwehrreaktionen toleriert wird. Die Effusionsmessungen von HELMS[21] und die autoradiographischen Versuche von HILDMANN, KOBURG und STEINBACH[24] zeigten ebenfalls die gute lokale Verträglichkeit von Cialit im Gewebe.

YANNOULIS[59] untersuchte die Erhaltung von Cialitkonservierten oder mit Biotherapeutika unterkühlten Transplantaten im Gewebe und fand nach Cialiteinwirkung eine Lockerung der Gelenke, hier vor allem zwischen Amboß und Steigbügel. MARQUET, VAN CAMP, DECRAEMER and CRETEN[43] wiesen nach, daß die Viscoelastizität des Hammer-Amboß-Gelenkes auch im konservierten Homoiotransplantat erhalten bleibe. Sie hatten die audiologischen Ergebnisse nach Myringoplastik, nach Tympanoplastik vom Typ III nach WULLSTEIN und nach einer Homoiotransplantation eines Blockes aus Trommelfell, Hammer und Amboß miteinander verglichen. Auf Grund physikalischer Überlegungen geben die Autoren dem Homoio-Blocktransplantat den Vorzug.

KHAN und SCHWAB[33] schliffen einen konservierten Homoioamboß als Winkelspan zurecht und setzten ihn als Ossikulakettenersatz ein. Die postoperative Untersuchung des Transplantats ergab, daß der denaturierte Knochen des Amboßtransplantats im Kern inert bleibt. Bei restaurie-

renden Eingriffen in die Schalleitungskette des Mittelohrs sprechen die klinischen Erfolge PLESTERs[47] für die Eignung konservierter homologer Trommelfell- und Knochentransplantate als Mittel der Wahl.

MARQUET, SCHEPENS and KUIJPERS[42] verwendeten Cialitkonservierte Homoiotransplantate bei den verschiedensten Operationsmethoden, die von der Myringoplastik bis zur kompletten tympano-malleolären Transplantation reichten. Ein Vergleich der postoperativen Ergebnisse zeigte durchweg gute Erfolge. MARQUET[41] nannte eine Erfolgsquote von 97%, bezogen auf 320 Fälle von Homoiotrommelfellen, die er nach Cialitkonservierung transplantiert hatte.

Biochemische Untersuchungen an cialitkonservierten allogenen und xenogenen Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantaten durch KASTENBAUER und HOCHSTRASSER[30] ergaben, daß die Proteinlöslichkeit an diesem Gewebe stark erniedrigt wird, woraus eine verzögerte Antigenfreisetzung und damit ein verzögerter Umbau cialitkonservierter Transplantate erfolgt. Die histologischen Befunde nach Amboßinterposition bei Paukenfibrose durch HELMS, HILDMANN und STEINBACH[22] zeigten die fortschreitende Substitution des Spendergewebes durch vitalen Knochen unter Erhaltung der äußeren Form.

Anwendung des Cialit in der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Tübingen

An der Tübinger HNO-Klinik wird seit etwa 10 Jahren mit gutem Erfolg Cialit als Konservierungsmedium für Mittelohrtransplantate verwendet. Durch die große Anzahl der anfallenden Tympanoplastik-Operationen muß stets eine Gewebebank mit genügend Homoiotransplantaten bereitstehen. STEINBACH und WEBER[54] haben die Vorteile der Aufbewahrung homologen Materials in Cialit gegenüber anderen

Konservierungsverfahren herausgearbeitet. Sie beschreiben die Vorzüge von Cialit wie folgt:

1.) Cialit ... in einer Verdünnung von 1 : 5 000 ... besitzt eine starke bakterizide und fungizide Wirkung ... Staphylokokken werden z.B. in der Cialitlösung nach 15 Minuten abgetötet.

2.) Die konservierten Knochentransplantate sind in Cialit bei Kühlschranktemperatur praktisch unbegrenzt haltbar.

3.) Die innerhalb von 24 Stunden nach dem Tode entnommenen Gehörknöchelchen sind ... nach 3-tägiger Konservierung in Cialit verwendbar.

4.) Die Transplantate können nach Abspülen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung sofort implantiert werden.

Die letztgenannte Eigenschaft des Cialit wird von HELMS[21] anders angesprochen. Seine Effusionsmessungen haben nämlich ergeben, daß es bei Konservierung von Geweben in Cialit- oder Merthiolatlösung zu einer Ansammlung von freiem Konservierungsmittel im konservierten Gewebe kommt. Um zu vermeiden, daß dieser Konservierungsstoff im Implantat wirksam wird, ist eine vorherige "Wässerung" notwendig. Große Transplantatstücke müßten vor Verwendung 12 bis 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung, kleinere, wie z.B. Gehörknöchelchen, 20 Minuten "gewässert" werden. Auch SCHMELZLE's[52] Untersuchungen und "Richtlinien zum Anlegen einer Knochenbank" sprechen für die Notwendigkeit der Beseitigung des freien Cialits.

Bakteriologische Untersuchungen

Wie aus der Literatur ersichtlich wird, ist eine Vielzahl unterschiedlichster Untersuchungen über die Eigenschaften des Cialit und des damit behandelten Gewebes angestellt worden. Bakteriologische Kontrollen der Gewe-

bekonserven haben nur wenige vorgenommen.

HAUBERG und BRUCKSCHEN[20], sowie GÜNTZ[14] nahmen routinemäßig Abstriche von ihren Transplantaten im Abstand von 4 Wochen ab, konnten jedoch keine Bakterien nachweisen. SCHMELZLE[52] nun untersuchte unter weitergehenden mikrobiologischen Gesichtspunkten Abstriche seiner Gewebekonserven, die in einer Cialitlösung 1 : 5 000 konserviert waren und fand in einem Fall Proteus-, Pseudomonasbakterien, Coli und Sarzinen nach 48-stündiger Bebrütung. Weitere Untersuchungen auf dieser Ebene, aber mit einer Konzentrationserhöhung der Cialitlösung auf 1 : 2 000, ergaben ebenfalls ein Wachstum von Keimen auf den Abstrichen. Er folgerte daraus, daß mit Bakterien kontaminierte Gewebe nicht zu konservieren seien. Da Cialit keine sichere bakterizide und fungizide Eigenschaft bei den verwendeten Konzentrationen besitzt, muß bei Entnahme der Gewebe und beim Umgang mit den Geweben Sterilität garantiert sein.

Neben diesen experimentellen Untersuchungen sind noch die klinischen Ergebnisse von NOVOTNY[44] bekannt, der Funktionsergebnisse bei Tympanoplastikoperationen vom Typ II und III in tropischen Gebieten untersucht hatte. Er fand eine negative Beeinflussung der Operationsergebnisse, die die mikrobielle Flora hervorgerufen hatte. Hier waren am häufigsten Proteus vulgaris und Pseudomonas aeruginosa vertreten.

Cialitbehandelte, homologe Gehörknöchelchentransplantate sind bislang noch nicht bakteriologisch untersucht worden.

Es soll das Ziel vorliegender Arbeit sein, das bakterizide Verhalten von Cialit auf verschiedenartige Ossikula als Keimträger zu untersuchen. In dem Konservierungsmittel sind sowohl von Leichen entnommene, als auch intraoperativ entfernte Gehörknöchelchen zu lagern. Es soll

festgestellt werden, ob die Zeitdauer der Konservierung und die Konzentration für die Sterilhaltung des Knochenpräparats von Bedeutung sind. Weiterhin soll die zusätzliche keimtötende Wirkung von Formalin auf die Krankheitserreger der Operationspräparate untersucht werden.

B.) Material:

Gehörknöchelchen: Als Keimträger wurden Ossikula verwendet, die aus frischen, tiefgefrorenen, menschlichen Felsenbeinen unter dem Operationsmikroskop mit nicht sterilisiertem Besteck herauspräpariert worden waren.

Anzahl: 64 Gehörknöchelchen, davon 28 Ambosse,
23 Hammer,
13 Steigbügel.

Für die Untersuchungsreihen an Operationsmaterial standen 26 Gehörknöchelchen oder deren Reste zu Verfügung.

Konservierungsmittel: Zur Konservierung der Knochenproben wurde Cialit verwendet, das von der ASID GmbH, München in Pulverform geliefert wurde. Die Verarbeitung zu einer gebrauchsfertigen, sterilen wässrigen Lösung erfolgte in der Universitätsapotheke der Universität Tübingen. Benutzt wurden die Konzentrationen:

1 : 1 000 (1g Pulver in 1 000 ccm Aqua bidest.) in 1-Liter-Flasche (Charge: 76247)

1 : 2 000 (1g Pulver in 2 000 ccm Aqua bidest.) in 1-Liter-Flasche (Charge: 76119)

1 : 5 000 (1g Pulver in 5 000 ccm Aqua bidest.) in 1-Liter-Flasche (Charge: 74036)

1 :10 000 Zur Herstellung dieser Verdünnung versetzten wir eine vorgegebene Menge der fertigen 1 : 5 000 - Lösung mit dem gleichen Volumen eines sterilen, pyrogenfreien Aqua bidestillata "Ampuwa" des Herstellers Fresenius, Bad Homburg.

4%-iges Formalin in wässriger Lösung

Nährmedien: Um den Keimen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, wurden folgende Nährlösungen und -böden verwendet, die in dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen nach den bei HABS und SEELIGER[17] beschriebenen Vorschriften hergestellt bzw. in gebrauchsfertigen Zustand versetzt worden waren:

Natriumthioglykolat-Nährlösung, flüssig, im Glasröhrchen;
Leberbouillon, flüssig, im Glasröhrchen;
Nährboden nach ENDO, fest, auf Petri-Gußplatte;
Frischblut- Agar, fest, auf Petri-Gußplatte;
Nährboden nach KLIGLER, modifiziert nach BADER, fest, in Glasröhrchen;
S.I.M.-Nährboden, fest, in Glasröhrchen;
Citrat-Nährboden, fest, auf Petri-Gußplatte;
Aesculin-Nährlösung, flüssig, in Glasröhrchen;
"Pril" - ENDO-Nährboden, fest, auf Petri-Gußplatte;
Anaerobier-Kultur nach FORTNER, fest, auf Petri-Gußplatte;
physiologische Kochsalzlösung (0,9 mg% NaCl), flüssig;

Sonstige Reagenzien:

Kaninchenblut- plasma
Eisen-III-Citrat-lösung
Färbemittel nach GRAM

Geräte: Mikroskop zum Betrachten der GRAM-Präparate: Binokular-Mikroskop (Wild-Heerbrugg, Schweiz) mit 900 facher Gesamtvergrößerung.
Unterdruck- Membranfiltersystem (Sartorius, Göttingen) sterile Selectronfilter- Blättchen mit 50 mm Durchmesser und 0,45 µm Porendichte (Charge: 364141) Hersteller: Schleicher + Schüll GmbH, Dassel.

Sonstiges: Zur Bearbeitung der Knochenproben fanden sterile spitze, chirurgische Pinzetten, Scheren und

Zangen der Otochirurgie Verwendung. Die Konservierungsmedien wurden mit sterilen Einmalspritzen und -kanülen entnommen. Sterile Petrischalen, Reagenzgläser, Glasflaschen und -kolben dienten zur Aufbewahrung der Untersuchungsobjekte.

C.) Methoden

I.) Überprüfung der von Leichen entnommenen Gehörknöchelchen auf ihren Gehalt an Keimen

1.) Präparation der Gehörknöchelchen

Die bei Sektionen entnommenen Felsenbeine wurden sofort eingefroren. Unter nicht sterilen Bedingungen zerteilten wir diese Felsenbeine mit einer elektrisch betriebenen Bandsäge durch einen Schnitt im medialen Teil des cavum tympani, um von der Schnittfläche her die unbeschädigten Ossikula erreichen zu können. Unter einem Operationsmikroskop konnten die Gehörknöchelchen dann entnommen werden.

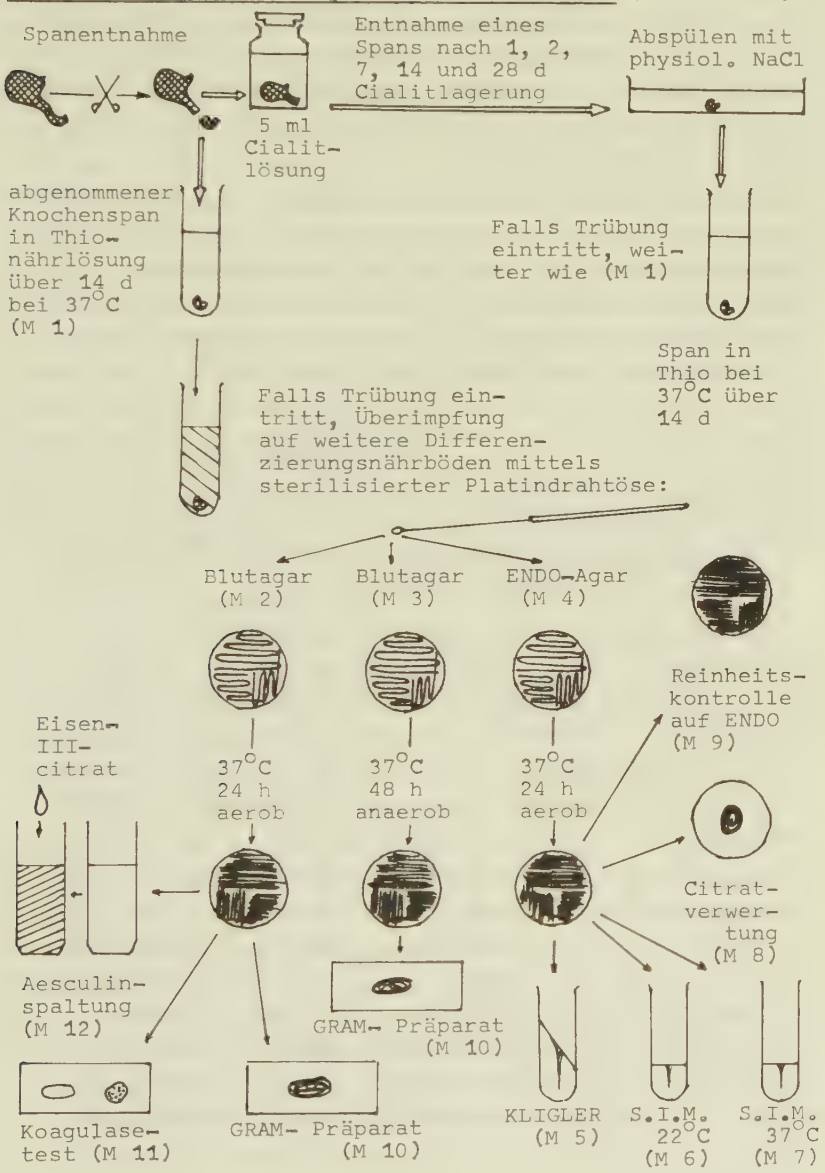
2.) Überprüfung der Gehörknöchelchen auf Kontamination mit Primärkeimen

a) Vorbereitungen und Vorversuche:

Die unter 1.) entnommenen Knöchelchen bewahrten wir bis zur Weiterverarbeitung in trockenen Gefässen bei 4-6°C auf. Von jedem Knochen wurde zur Primärkeimbestimmung ein Span abgehoben. Die Größe dieses Spans schwankte zwischen 0,5 und 1,0 mm^3. Für diesen Arbeitsgang fand ein Operationsbesteck Verwendung, das in seiner Art in der Otochirurgie für Mikrooperationen am Mittelohr benutzt wird. Dieses Besteck wurde vor jeder Berührung mit einem Knochen oder einem Span durch Ausglühen über der Bunsenbrennerflamme sterilisiert. Als Arbeitsplatten dienten sterile Petrischalen.

Forts. S.18

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (siehe Text)



Der so unter sterilen Bedingungen entnommene Knochenspan wurde in 10 ml Natriumthioglykolat-Nährlösung eingebracht. Die Wahl fiel deshalb auf ein flüssiges Nährmedium, weil die Kontaktfläche zwischen dem Objekt und einer Flüssigkeit größer und damit besser als bei einem festen Nährboden ist (BADER[1]).

Vor Beginn unserer Untersuchungen hatten wir Vorversuche mit einigen indifferenten Knochenspänen aus einem Felsenbein angestellt, um unter den zur Verfügung stehenden flüssigen Nährmedien das optimale auszuwählen (BADER[1]). Hier erwies sich die Natriumthioglykolat-Lösung im Vergleich mit Leberbouillon als die geeignetere, da sie den Keimen die Möglichkeit zu einem schnelleren und damit besseren Wachstum bot. Da das verwendete Thioglykolat ein gutes Reduktionsmittel ist, bot es aerob wie anaerob gedeihenden Bakterien gleichermaßen gute Wachstumsbedingungen.

b) Anlage der Bakterienkulturen (siehe schematische Darstellung der Methode: M 1 - M 12)

Die in Thio-Nährlösung (M 1) gebrachten Knochenproben mußten über 14 Tage bei 37°C bebrütet werden. Diese verhältnismäßig lange Bebrütungsdauer wurde deshalb gewählt, um auch langsam wachsenden Bakterien die Möglichkeit zu geben, sich zu entwickeln. Trat innerhalb dieser Zeit eine deutliche Trübung der vorher klaren Lösung auf, so deutete dies auf Bakterienwachstum hin.

Ein bis drei Tropfen der aufgeschüttelten Nährlösung wurden mit einer ausgeglühten Platindrahtöse auf feste Nährböden überimpft, um verschiedene Keime voneinander trennen zu können. Wir verwendeten hierzu Frischblutplatten zur aeroben (M 2) und anaeroben (M 3) Bebrütung und Agargußplatten nach ENDO (M 4). Die Blutplatten boten für alle Bakterienarten ausreichende Nährstoffe an, während die ENDO - Platte einen Elektivnährboden für Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae darstellte (KAUFFMANN[31,32]).

Die aerobe Bebrütung der ENDO - Platte und einer Blut-Platte dauerte ca. 24 Stunden, die zweite Blut-Platte stand zur Anaerobierzüchtung über 48 Stunden bei 37°C und 100 Torr im Brutschrank.

Eine weitere Methode, Anaerobier zu züchten, bietet sich in dem Verfahren nach FORTNER an (HALLMANN[19]). Hier werden der zu untersuchende Keim und ein Sauerstoff verzehrender, bekannter Bakterienstamm in ein gemeinsames, luftdicht verschlossenes System gebracht. Ein Kontakt beider Keime muß ausgeschlossen sein. Als Aerobier wird zumeist Serratia marcescens (syn. Bact. prodigiosum) oder Escherichia coli benutzt, um den im System befindlichen Sauerstoff zu verbrauchen.

c) Differenzierung der Keime

Von den auf der ENDO - Platte gewachsenen Kolonien wurden je eine der voneinander erkennbar unterscheidbaren, isoliert stehenden Reinkulturen auf folgende Differenzierungsnährmedien überimpft:

aa) Stichimpfung in den Zweifachzucker-Schrägagar nach KLIGLER, modifiziert nach BADER (M 5) zur Bestimmung der Zuckerverwertung, der Schwefelwasserstoffbildung und der Gasbildung.

ab) Stichimpfung in den S.I.M.-Agar zur Überprüfung der Schwefelwasserstoffbildung und der Beweglichkeit (Mobilität). Indolverwertung wurde nicht getestet. Dieser Nährboden wurde sowohl bei 22°C (M 6) als auch bei 37°C (M 7) bebrütet, um den verschiedenen, beweglichen Bakterienstämmen ihr jeweiliges Temperaturoptimum zu bieten.

ac) Stichimpfung in den synthetischen Citrat-Nährboden (M 8) zur Feststellung, ob der fragliche Keim Citrat als einzige Kohlenstoffquelle verwerten kann. Bei positivem Ausfall bildet sich um den Einstich im grün

gefärbten Agar eine blaue Reaktionszone.

ad) Ausstrich auf einen weiteren Nährboden nach ENDO zur Reinheitskontrolle (M 9).

Die Differentialdiagnose GRAM- negativer Darmkeime erfolgte nach folgenden Schemata (Tabellen I und II):

Tabelle I, abgewandelt nach HALLMANN[19]:

GRAM- negative Darmbakterien	Schrägagar nach KLIGLER/BADER			
	Schräg-fläche	Stich	Gas-bildung	H_2S-bildung
Escherichia- Gruppe	gelb	gelb	+	(-)
Gruppe der coliformen Bakterien	rot	gelb	+	(-)
Alcaligenes faecalis	rot	rot	-	-
Pseudomonas aeruginosa	rot	rot	-	-
Proteus- Gruppe: P.vulgaris, mirabilis	rot	rot	(+)	+ schmutzig-grün
P.morgani, rettgeri	rot	rot	-	-
S.paratyphi B, S.enteritidis, S.typhimurium u.a. Salmonellen	rot	gelb	+	+ tiefschwarz
S.typhi	rot	gelb	-	+ nur im oberen Teil des Stichs
Shigella- Gruppe	rot	gelb	-	-
Klebsiella- Gruppe	gelb	rot	++	-
Enterobacter	gelb	rot	++	-

\+ = positive Reaktion
++ = stark positive Reaktion
(+) = verzögert oder schwach positive Reaktion
\- = negative Reaktion
(-) = verzögert oder schwach negative Reaktion

Tabelle II:

GRAM- negative Keime	Citrat-verwertung	S.I.M.- Nährboden	
		H_2S	Beweglichkeit
Escherichia coli	-	-	+
coliforme Bakterien	-	-	+
Pseudomonas aerug.	+	-	+
Proteus- Gruppe	-	+/-	+
Klebsiella- Gruppe	+	-	-
Enterobacter	+	-	+

+ = positive Reaktion - = negative Reaktion
+/- = je nach Genus positiv oder negativ

Von den auf den Blutplatten gewachsenen Kolonien fertigten wir zuerst mikroskopische Präparate (M 10) an und färbten sie nach GRAM. Die hiervon GRAM- positiven Kugelbakterien wurden auf ihre Morphologie, auf Aesculinspaltung (M 12), Hämolyse (alpha- und beta- Typus) und Plasmaagglutinierung (M 11) überprüft:

ba) Aesculin ist ein Glykosid aus Roßkastanien und wird von manchen Bakterienstämmen in Glukose und Aesculetin gespalten, das nach Zugabe von Eisen-III-citrat schwarz ausfällt (HALLMANN[19]).

bb) Alpha- hämolysierende Keime bilden aus dem Hämoglobin der Blutplatte ein dem Methämoglobin ähnliches, grünes Abbauprodukt des Hb, das auf der Blutplatte als "Vergrünung" makroskopisch gut erkennbar ist (WIESMANN[56], HALLMANN[19]).

Die beta- Hämolyse bedeutet vollständig Zerstörung der Erythrozyten unter Freisetzung des Hämoglobins, was einen hellen Hof um die Kolonien auf der Blutplatte erkennen läßt (JAWETZ, MELNIK und ADELBERG[29]).

bc) Das Enzym Plasmakoagulase, das nur von Staphylococcus aureus gebildet wird, vermag Kaninchenblut- Plasma zur Koagulation zu bringen. Um Spontankoagulationen, wie sie bei anderen Keimen unter bestimmten Voraussetzungen vorkommen können, auszuschließen, mußte stets eine Leerprobe mit Kochsalzlösung zum Vergleich vorgenommen werden.

Folgendes Schema diente zur Differenzierung:

Tabelle III:

Keim	GRAM-Präp. / Morphol.	Aesculin-spaltung	Koagulase / Agglutinat.	Hämolyse
Staphylococcus aureus	kugelförmig in Haufen	-	+	beta
Streptococcus faecalis (syn. Enterokokken)	kugelförmig in Haufen od. kurzen Ketten	+	-	div.
Streptococcus viridans (syn. alpha-häm.St.)	kugelförmig in Ketten	-	-	alpha
beta-hämolys. Streptokokken	kugelförmig in Ketten	-	-	beta
Familie der Micrococcaceae	kugel- bis lanzettförmig in Haufen	-	-	-

\+ = positive Reaktion - = negative Reaktion

In die Familie der aeroben Micrococcaceae werden nach neuester Nomenklatureinteilung von BERGEY die Genera Micrococcus, Staphylococcus und Planococcus eingeordnet (SKERMAN[53]). In der vorliegenden Arbeit konnten also "apathogene Mikrokokken" oder Staphylococcus epidermidis als zu der Familie der Micrococcaceae gehörend bezeichnet werden. BERGEY[2] rechnet das Genus Sarcina nun nicht mehr zu den Mikrokokkazeen, sondern zu der obligat anaerob wachsenden Familie der Peptococcaceae.

Die im GRAM- Präparat positiv gefärbten Stäbchenbakterien prüften wir auf Sporenbildung, sofern eine solche nicht schon unter dem Mikroskop zu erkennen war. Die mit den fraglichen Sporenbildnern in Reinkultur bewachsene Blutagarplatte wurde mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Diese Bakterienaufschwemmung kochten wir im Wasserbad über 5 Minuten und brachten sie anschließend in Thioglykolat- Nährlösung ein. Ein Wachstum nach Bebrütung deutete auf überlebende Sporen hin, aus denen sich neue vegetative Formen entwickelt haben mußten, da durch das Kochen die ursprüngliche vegetative Lebensform abgetötet worden war.

GRAM- positive, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien reihten wir entweder unter die Lactobazillen ein oder rechneten sie zu den Korynebakterien, die an ihrer keulenförmigen Gestalt (coryne, griech.= Keule) identifiziert werden konnten. Die Differentialdiagnose erfolgte hier unter morphologischen Gesichtspunkten.

GRAM- negative Stäbchen, die zwar auf Blut-, nicht aber auf ENDO- Agar wuchsen und damit nicht zu den Enterobacteriaceae gehörten, überimpften wir von der Blutagar-Platte auf den polytrophen Nährboden nach KLIGLER/BADER, auf die S.I.M.- Nährböden und auf eine Citratplatte. Die Diagnose stellten wir ebenfalls nach den Tabellen I und II (siehe Seiten 20 und 21).

Da manche Bakterienstämme, vor allem aber Proteus, zum Schwärmen auf dem Nährboden neigen, ist in einem solchen Fall eine Trennung der überimpften Keime in Reinkulturen unmöglich. Durch das Abschwemmen der Agarplatte mit "Pril"-wasser konnte die Oberflächenspannung des Agarmaterials herabgesetzt werden, was das Ausschwärmen der Keime weitgehend verhindert.

II.) Überprüfung des Keimgehalts und -wachstums in Gehörknöchelchen nach Konservierung in Cialit

1.) Aufbereitung der Konservierungslösungen

Kleine Glasflaschen mit Gummistopfen wurden unter heißem Dampf sterilisiert (autoklaviert). Das Fassungsvermögen der Fläschchen betrug je nach Größe zwischen 10 und 30 ml. Diese Gefäße wurden mit je 5 ml Cialit-Lösung gefüllt, die unter sterilen Bedingungen mit Einmalspritzen und -kanülen aus den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Vorratsflaschen entnommen wurde. Diese Vorratsflaschen ähneln den üblichen Infusions- oder Transfusionsflaschen mit durchstoßbarem Gummistopfen und Metallcouverture. Das Cialit gaben wir sofort in die vorbereiteten und beschrifteten Probefläschchen.

2.) Eingabe der Knochen in die Cialitlösung

Nach Abtrennung des für die Primärkeimbestimmung (siehe I, 2, a) bestimmten Knochenspans wurde das verbleibende Gehörknöchelchen unter sterilen Bedingungen in das vorgesehene Probefläschchen gegeben. Die weitere Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4-6 ^{o}C.

3.) Probenentnahme

Nach Ablauf von 1 Tag, 2 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 28 Tagen Lagerung in Cialit wurde je ein Span des Knochens entnommen. Die Technik ist unter I, 2, a beschrieben worden. Ein Abspülen mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung befreite den Span von anhaftendem Cialit. Damit verhinderten wir, daß das Konservierungsmedium mit der Nährlösung in eine unkontrollierbare Wechselwirkung trat.

Diesen Span brachten wir ebenfalls in Natriumthioglykolat-Nährlösung ein, um eventuell noch überlebenden Keimen ein Wachstum zu ermöglichen. Die Differenzierung erfolgte wie beschrieben.

III.) Überprüfung der Konservierung intraoperativ entnommener, entzündlicher Gehörknöchelchen

1.) Auswahl und Präparation der Gehörknöchelchen

Für unsere Untersuchungen standen frische Gehörknöchelchen, respektive deren Reste aus dem Operationssaal der Tübinger Hals-, Nasen- und Ohrenklinik zur Verfügung, die am Untersuchungstag entnommen worden waren. Als Indikation zu diesen Mittelohroperationen wurde meist Otitis media chronica mit und ohne Cholesteatombildung genannt. Besonders bei der chronischen Mittelohrentzündung sieht ZÖLLNER[60] in der hörverbessernden Operation eine schwierigere Aufgabe für den operierenden Otochirurgen als in der Otoskleroseoperation, die bei unseren bakteriellen Untersuchungen keine Berücksichtigung fand, da sie einen nicht entzündlichen Mittelohrprozeß darstellt.

Eine entzündliche Erkrankung wird stets durch einen oder mehrere pathogene Keime verursacht. Bei der chronischen Otitis media konnten wir von vornherein mit der Anwesenheit von Bakterien rechnen.

Als Erreger dieser Erkrankung sind verschiedene Keime bekannt:

GROSS und SCHÖLMERICH[16] nennen Proteus, Staphylokokken oder Pseudomonasbakterien.

PLESTER[49] beschreibt die chronische Otitis media als "Endzustand primär verschiedener Krankheitsprozesse, die die Voraussetzung zu ihrer Entstehung schaffen": z.B. Scharlach, Masern, Diphtherie; Erkrankungen, die auch Cholesteatombildung zur Folge haben können.

Vor Weiterbehandlung der dieserart kontaminierten Gehörknöchelchen mußte wiederum ein Span zur Primärkeimbestimmung abgehoben werden.

2.) Konservierung der Operationspräparate

Die Ossikula teilten wir in zwei Serien ein:

Eine Serie wurde einer zusätzlichen Formalinbehandlung unterzogen. Die Einwirkung von 10 ml 4%-iger, wässriger Formalinlösung auf jedes Knöchelchen erfolgte in einem sterilen Glasröhrchen mit Stopfen über 24 Stunden bei 4-6°C. Die derart vorkonservierten Knochen spülten wir nun mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung ab und gaben sie in eine Cialitlösung mit der Konzentration 1 : 5 000. Zur Bestimmung etwa vorhandenen Keimgehalts mußten abermals nach 1, 2, 7, 14 Tagen Lagerungsdauer Späne wie beschrieben abgehoben und in Nährlösung gebracht werden.

Die zweite Serie diente als Vergleichskollektiv ohne Formalin-Vorbehandlung.

IV.) Feststellung des Keimgehalts in den Cialitlösungen selbst mittels Membranfiltersystems

Da Bakterien nicht nur auf den Ossikula als Keimträgern vorhanden sein konnten, sondern auch als Suspension frei in der Konservierungslösung selbst, fand eine Membranfilteranlage zum Nachweis in Lösung befindlicher Keime Anwendung.

Nach Beendigung der Konservierungsdauer gaben wir die Cialitlösungen aus den benutzten Probenfläschchen auf eine sterile Filtermembran mit 0,45 µm Porendichte in einer ebenfalls sterilen SARTORIUS-Membranfilteranlage. Mit Unterdruck wurde dann die Flüssigkeit durch das Filterblättchen gesaugt und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung nachgespült.

Sollte das Konservierungsmedium noch mit Keimen kontaminiert gewesen sein, mußten diese im bakteriendichten Filter aufgefangen worden sein.

Mit einer ausgeglühten Pinzette wurde nun das Filter-

blättchen in eine 100 ml- Weithalsflasche mit 60 ml steriler Thioglykolatlösung überführt. Auch hier dauerte die Bebrütung bei 37°C 14 Tage. Die Weiterbehandlung erfolgte wie unter I, 2, b ff beschrieben.

V.) Kontrolle der bakteriziden Wirksamkeit des Cialit

Ausbleibende Vermehrung in einer beschickten Nährlösung kann einerseits Keimfreiheit bedeuten, andererseits aber auch Wachstumsschwäche der vorhandenen Keime.

Um ein solches falsch-negatives Ergebnis in unseren Untersuchungsreihen auszuschließen, überprüften wir gesondert die keimtötende Wirkung des Konservierungsmittels. Dazu verwendeten wir eine bekannte Bakteriensuspension in vorgegebener Konzentration.

Je ein Tropfen einer 24 Stunden alten Staphylokokkenaufschwemmung in der Verdünnung 1 : 10 000 wurde in je 5 ml der verwendeten Cialitkonzentrationen überimpft. Nach 1 Tag, 2 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 28 Tagen gaben wir je eine Probe hiervon in Thio-Nährlösung zur Bebrütung.

VI.) Überprüfung der Sterilität der Arbeitsbedingungen

Da eine Kontamination der Gehörknöchelchen wie auch der Nährmedien sekundär erfolgen kann, mußten jeder einzelne Arbeitsgang und alle Geräte auf Keimfreiheit überprüft werden.

1.) Geräte

Sämtliche benutzten Geräte wie Pinzetten, Scheren, Zangen, Kanülen wurden mehrmals auf Blutagar-Platten abgedrückt, um daran eventuell haftende Keime zu erfassen.

Petrischalen und Gläser schwemmten wir mit Nährlösung ab, die wir ebenfalls einer Bebrütung aussetzten. Die Membranfiltermethode kontrollierten wir durch mehrfache durchgeführte Leerproben auf Sterilität.

2.) Konservierungsmedien

Um eine Sekundärkontamination der Cialitlösungen zu erkennen, gaben wir je 5 ml der Konzentrationen 1 : 1 000, 1 : 2 000, 1 : 5 000 und 1 : 10 000 in 20 ml Thioglykolatlösung.

3.) Nährmedien

Von sämtlichen benutzten Nährböden und -lösungen (siehe: Material) wurden mehrere Exemplare unbeimpft bebrütet.

4.) Laborluft

Während des gesamten Arbeitsganges, der die Entnahme eines Spans vom Knochen, Eingabe in Cialit, bzw. Entnahme des Spans aus der Konservierungslösung, Abspülung mit physiologischer NaCl und Eingabe in Nährlösung umfasste, verwendeten wir offene, sterile Blutagarplatten. Anschliessend wurden diese Platten bebrütet und die darauf gewachsenen Bakterien zur Feststellung der Identität der vorhandenen Luftkeime wie beschrieben ausdifferenziert.

D.) Ergebnisse

Untersuchtes Leichenmaterial

Die von Leichen stammenden Gehörknöchelchen wurden vor Behandlung mit dem Konservierungsmedium auf Kontamination mit Bakterien überprüft. Da sie weder unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen noch mit sterilem Besteck den Felsenbeinen entnommen worden waren, konnte von vornherein mit Anwesenheit von Keimen gerechnet werden. Dies führte uns jedoch nicht zu der Schlußfolgerung, daß j e d e Knochenprobe zwangsweise mit Keimen behaftet sein mußte.

Von 64 Ossikula, die vor der Cialit-Konservierung auf Primärkeime untersucht worden waren, wiesen 25 keine Kontamination auf. Nach Überführung der Knochenproben in Natriumthioglykolat-Nährlösung und 14 Tage dauernder Bebrütung bei 37°C war bei diesen Fällen keine Trübung der im sterilen Zustande klaren Lösung zu erkennen, was auf Bakterienwachstum hätte hindeuten können.

Eine leichte Opalescenz der Lösung nach längerem Stehen wurde durch den in dieser Nährlösung enthaltenen, viskösen Agar verursacht. Zahlreiche Überimpfungen auf weitere Nährmedien zeigten in keinem Falle die Anwesenheit von Keimen an. Wir schlossen daraus auf eine Keimfreiheit der fraglichen Proben.

An den Gehörknöchelchen, die primär mit Bakterien kontaminiert waren, konnten mit färberischen und biochemischen Methoden folgende Keime identifiziert werden:

GRAM-positive Kugelbakterien: alpha-hämolysierende Streptokokken (syn. Str. viridans)
beta-hämolysierende Streptok.
Enterokokken (Str. faecalis)
Staphylococcus aureus
Familie: Micrococcaceae

GRAM-positive Stäbchenbakterien:	Lactobacillen
	aerobe Sporenbildner
GRAM-negative Stäbchenbakterien:	Pseudomonas-Gruppe
	(hier: Ps. aeruginosa)
	Proteus-Gruppe
	Klebsiella
	Enterobacter
	Escherichia coli
	Coliforme Bakterien

Die Frage, woher die genannten Bakterien stammten, führte zur Untersuchung der Umgebung der Gehörknöchelchen, vor allem jedoch der Laboratoriumsluft.

Die während unserer Untersuchungen offen aufgestellten Blutagarplatten (siehe Methoden: VI, 4) zeigten nach Bebrütung und Differenzierung eine breite Palette der unterschiedlichsten Luftkeime. So konnten z.B. in einem einzigen Nährboden nebeneinander aerobe Sporenbildner, Neisserien, coliforme Bakterien, Staphylokokken und Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen werden.

Auch die Benutzung der elektrischen Bandsäge (Methoden I, 1) im Tierlabor, die sonst nur für tierexperimentelle Arbeiten zur Verfügung steht, hatte eine Verunreinigung der Knochenpräparate zur Folge.

Kontrolle der Cialitwirksamkeit auf Bakterien

Nach 1 Tag Lagerung in Cialit bei 4-6°C konnten noch in 12 von 39 Proben Keime nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um dieselben Bakterien, die als Primärkeime identifiziert worden waren. Eine Abhängigkeit der Wachstumshemmung von der verwendeten Konzentration war hier nicht erkennbar.

2 Tage Cialiteinwirkung auf die kontaminierten Knochen-

proben ergab, daß nach Bebrütung in Thioglykolat noch in 8 Fällen vor allem aerobe Sporenbildner, Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken und Vertreter der Familie Micrococcaceae nachweisbar waren. Auch hier konnte kein Unterschied in der Wirkung der Konzentrationen festgestellt werden.

Nach 7-tägiger Lagerung in Cialit zeigten noch aerobe Sporenbildner bei 4 Proben und Enterokokken bei 2 Proben Wachstum.

Erst nach 14 Tagen Cialitwirkung konnte in keinem Fall mehr Bakterienwachstum festgestellt werden. Auch die sicherheitshalber vorgenommene 28-tägige Lagerung in Cialit brachte dasselbe Ergebnis.

Ein Zusammenhang zwischen den verwendeten Verdünnungen des Konservierungsmediums und der Wachstumstendenz der Bakterien konnte nicht festgestellt werden. Die Verteilung ergab folgendes Bild:

Tabelle IV

Anzahl der Nährlösungen mit Keimwachstum							
vor der Konservierung	Cialitkonzentration	nach 1 d	nach 2 d	nach 7 d	nach 14 d	nach 28 d	nach Membranfilterung
		Lagerung in Cialit					
10	1: 1000	3	2	1	-	-	-
11	1: 2000	3	1	2	-	-	-
9	1: 5000	3	3	1	-	-	-
9	1:10000	3	2	2	-	-	-

Auch im Konservierungsmittel selbst konnte mit der Membranfiltermethode nach Ablauf der Lagerungsfrist keiner der primär gefundenen Keime nachgewiesen werden.

Kontrolle der Arbeitsgeräte und -reagentien auf Verunreinigung

Wie in: Methoden VI, 1 - 3 beschrieben, wurden Geräte und Reagentien (Nährlösungen, Nährböden und Konservierungsmittel) auf Kontamination überprüft.

Die Blutagar-Platten, auf denen wir die Präparationsbestecke (Pinzetten, Scheren, Zangen und Kanülen) mehrfach abgedrückt hatten, zeigten trotz längerer Bebrütung kein Bakterienwachstum. Die Verwendung von Einmalgeräten und das Ausglühen der benutzten Instrumente genügten also den Erfordernissen keimfreien Arbeitens.

Keine Keime enthielten auch die Konservierungsmittelproben zu je 5 ml, die den Vorratsflaschen mehrmals mit verschiedenen Kanülen und Spritzen entnommen worden waren.

Trotz Bebrütung über längere Zeit blieben die unbeimpften Nährböden und -lösungen steril. Diese Kontrollen wurden mehrmals wiederholt.

Die gute bakterizide Wirksamkeit aller verwendeten Cialitlösungen zeigte sich durch die Abtötung einer bekannten Bakteriensuspension nach bereits 1 Tag Konservierung.

Untersuchtes Operationsmaterial

Allen Konservierungsversuchen gingen Primärkeimbestimmungen voraus. Diese Untersuchungen ergaben, daß die intraoperativ entnommenen Reste von Gehörknöchelchen mit Pseudomonas aeruginosa, verschiedenen Proteusarten oder Vertretern der Familie Micrococcaceae, darunter Staphylococcus aureus infiziert waren.

Vor der Konservierung mit im Verhältnis 1 : 5000 verdünnten Cialit-lösung war die Hälfte unserer Operationspräparate der Einwirkung von 4%-iger Formalinlösung über 24 Stunden bei 4 - 6°C ausgesetzt. Die Untersuchung nach weiteren 24 Stunden Cialitwirkung ergab in keinem Fall Kontamination

mit den Keimen, die schon primär bestimmt worden waren. Auch nach jeweils 2, 7, 14 Tagen Cialitlagerung konnte das Vorhandensein von Bakterien oder deren Wachstum nicht mehr nachgewiesen werden.

Der zweite Teil unseres Operationsgutes wurde nur der Cialit-, nicht jedoch der Formalinbehandlung unterzogen, um als Vergleichsserie zu dienen. Während die meisten der genannten Keime schon nach 1 Tag Lagerung in Cialit nicht mehr nachweisbar waren, zeigten die Proteusbakterien auch 7 Tage nach (reiner) Cialitbehandlung noch deutliches Wachstum. Erst eine 14-Tage lange Konservierung in Cialit brachte den Nachweis der Keimfreiheit.

Die Tabellen V veranschaulichen die Wachstumstendenz von otopathogenen Keimen in Abhängigkeit von den verwendeten Konservierungsmedien:

Tabelle V a

vor Konservierung	nachgewiesene Keime nach Konservierung mit				
	Formalin 1 d	Cialit 1 d	Cialit 2 d	Cialit 7 d	Cialit 14 d
Proteus	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-
Familie der Micrococcaceae	-	-	-	-	-

Tabelle V b

vor Konservierung	nachgewiesene Keime nach Konservierung mit			
	Cialit 1 d	Cialit 2 d	Cialit 7 d	Cialit 14 d
Proteus	+	+	+	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-
Familie der Micrococcaceae	+	-	-	-

+ = Wachstum - = kein Wachstum

In einigen Fällen konnte eine Sekundärkontamination festgestellt werden. Es handelte sich dabei meist um anaerobe Korynebakterien (diphtheroide Stäbchen), die zur normalen Flora des Mundes, der Nase und des oberen Respirationstrakts gehören. Der Nachweis dieser Keime wurde morphologisch unter dem Mikroskop erbracht. Die Bakterien mußten durch den Staub oder ausgeatmete "Tröpfchen" auf die Ossikula gelangt sein. Aber auch diese Erreger konnten durch die verwendeten Konservierungsmittel zuverlässig abgetötet werden.

E.) Diskussion der Ergebnisse

Leichenmaterial:

Das in den Konzentrationen 1 : 1 000, 1 : 2 000, 1 : 5 000, 1 : 10 000 verwendete Konservierungsmittel "Cialit" zeigte eine gute bakterizide Wirksamkeit. Allerdings muß die Lagerungsdauer mindestens zwei Wochen betragen, um sichere Keimfreiheit zu gewährleisten.

Von einigen Autoren werden jedoch andere Zeitangaben gemacht: HAUBERG und BRUCKSCHEN[20] nennen als Mindestkonservierungsdauer 8 Tage, STEINBACH und WEBER[55] 3 Tage, HILDMANN und STEINBACH[23] konservierten Fascientransplantate zwischen 3 und 15 Tagen. Eine Abhängigkeit der Einheilungstendenz von der Konservierungsdauer sei nicht erkennbar gewesen. SCHMELZLE[51] schreibt schließlich in seinen "Richtlinien" eine Konservierungsdauer von mindestens 4 Wochen vor.

Der Grund für diese so unterschiedlichen Angaben ist unserer Ansicht nach in der Verschiedenheit der Versuchstechnik und der Beschaffenheit des konservierten Materials zu suchen. SCHMELZLE z.B. konservierte Knochenteile bis zu der Größe eines menschlichen Unterkiefers, deren vollständige Durchdringung mit der Cialitlösung naturgemäß eine wesentlich längere Zeit beansprucht als die Konservierung unserer zum Teil nur stecknadelkopfgroßen Gehörknöchelchen. Eine unvollständige Konservierung kann also durchaus ein Fortbestehen des Bakterienwachstums bedeuten.

Alle bisher durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen mit Cialitkonserven befassten sich nur mit dem Keimwachstum auf Gewebeabstrichen. Um zu genaueren, reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen, verwendeten wir regelrechte Knochenspäne, auf denen wir das Keimwachstum vor und nach der Konservierung untersucht hatten.

Einen Unterschied in der bakteriziden Wirksamkeit der verwendeten Konzentrationen konnten wir nicht feststellen. Wir folgerten daraus, daß auch die stärkste Verdünnung von 1 : 10 000 noch ausreichende Wirkung besitzt.

Auch GRÜTER's[13] Suspensionsversuche mit Cialit bescheinigten dieser schwach konzentrierten Lösung gute Bakterizität.

An unseren Untersuchungsergebnissen ist auffallend, daß vor allem Bakterien-Dauerformen am längsten der keimtötenden Wirkung von Cialit widerstehen konnten. Auch hier zeigt sich wieder einmal die außerordentlich starke Resistenz von Bakterien-Sporen gegenüber äußeren Einflüssen jeglicher Art.

Operationsmaterial:

Wie der Vergleich zwischen den verwendeten Konzentrationen gezeigt hatte, konnte keine Abhängigkeit der Wachstumshemmung hiervon festgestellt werden. Da über die im Verhältnis 1 : 5 000 verdünnte Cialitlösung die meisten klinischen und experimentellen Erfahrungen vorliegen, verwendeten wir diese Konzentration für unsere Versuche an frisch entnommenem Operationsmaterial.

Wie aus den Tabellen V a) und V b) ersichtlich ist, zeigte die Vorkonservierung der Knochenproben mit Formalin eine deutliche Verkürzung der Lagerungsdauer, die zum Erreichen der Keimfreiheit notwendig war. Hier konnte schon nach 1 Tag Formalinlagerung und weiteren 24 Stunden Cialiteinwirkung kein Bakterienwachstum mehr festgestellt werden, während bei der Verwendung der Cialitlösung allein Keime bis zu 7 Tage Konservierungsdauer nachzuweisen waren.

Gegen die Verwendung von Formalin als Konservierungsmedium sprechen die klinischen und experimentellen Erfahrungen, die VAN DEN BROEK and KUIJPERS[5] gemacht haben.

Ihre Untersuchungen haben ergeben, daß Formalin die Fähigkeit zur Knochenneubildung im Transplantat völlig beseitigt. Nach der von ihnen beschriebenen Methode hatten sie die Knochenproben über 1, 8 und 17 Wochen in 4%-iger, wässriger Formalinlösung bei Kühlschranktemperatur gelagert.

Im Gegensatz dazu hatten wir unsere Präparate lediglich für 24 Stunden in Formalin gelagert, anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung abgespült und dann in Cialit überführt. Diese relativ kurze Einwirkzeit des Formalins genügte zur Konservierung des Knochenmaterials, dürfte jedoch die osteogenetische Potenz des Transplantats nicht beeinflußt haben. Derart konservierte Homoiotransplantate zeigten postoperativ eine gute Einheilungstendenz, wie die klinischen Erfahrungen an der Tübinger Hals-, Nasen- und Ohrenklinik ergeben haben.

F.) Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde die Wirksamkeit des queck-silber-organischen, bakteriostatischen und bakteriziden Konservierungsmittels Cialit auf Gehörknöchelchen als Keimträger untersucht.

In der Literatur werden gute klinische Erfolge und experimentelle Erfahrungen mit Cialit als Konservierungsmittel für homologe Transplantate beschrieben.

Für unsere Untersuchungen dienten sowohl in Sektionen als auch intraoperativ entnommene Ossikula als Versuchsobjekte. Der Keimgehalt dieser Knochen wurde jeweils vor der Konservierung festgestellt. Die Cialitkonservierung der Sektionspräparate erfolgte dann mit den Verdünnungen 1 : 1 000, 1 : 2 000, 1 : 5 000 und 1 : 10 000. Die Operationspräparate unterlagen einer vorausgehenden, 24-stündigen Konservierung mit 4%-iger Formalinlösung. Die weitere Konservierung nahmen wir mit einer 1 : 5 000 -verdünnten Cialitlösung vor.

Nach Zeitabständen von 1, 2, 7, 14, 28 Tagen Cialitlagerung entnahmen wir den Präparaten je einen kleinen Knochenspan, um ihn auf überlebende Keime zu überprüfen. Dazu mußte jeder Span vor der bakteriologischen Ausdifferenzierung durch Abspülen mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung von dem noch anhaftenden Konservierungsmittel befreit werden.

Die kulturellen Untersuchungsreihen zeigten keine Abhängigkeit der Wachstumshemmung und der Bakterienabtötung von den benutzten Konzentrationen. In allen Fällen äußerte sich die gleichermaßen gute bakterizide Wirksamkeit der verwendeten Cialitlösungen in einer Keimfreiheit nach 14 Tagen Konservierung. Dies gilt sowohl für Leichenmaterial als auch für Gehörknöchelchen, die von Lebenden entnommen worden waren.

Die zusätzliche, 24-stündige Formalinvorkonservierung der Operationspräparate ergab eine deutliche Verkürzung der Behandlungsdauer mit Cialit von 14 auf 3 Tage.

Die Überprüfung der Methodik und ihrer möglichen Fehlerquellen bescheinigte eine den Ansprüchen genügende Keimfreiheit aller Arbeitsgänge und -materialien.

G.) Literaturverzeichnis

1.) BADER, R.-E.: Persönliche Mitteilungen (1976)

2.) BERGEY's Manual of determinative bacteriology
Baltimore (1975) 8. Auflage

3.) BETOW, K.: Transplantation von Trommelfell und Gehörknöchelchenkette. Klinische Erfahrungen bei der Verwendung von Homoiotransplantaten bei der Typanoplastik.
Verlag W. de Gruyter & Co. (1970) 1. Auflage

4.) BOENNINGHAUS, H.-G.: Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HTB, Springer Verlag (1970) 3. Aufl. Heidelberg

5.) BROEK, VAN DEN P. and W. KUIJPERS: The effect of preservation on the behaviour of homologous ossicular grafts.
Acta Otolaryng. (Stockholm) 77 (1974) 335- 343

6.) BRUCKSCHEN, E.: Erfahrungen mit der Knochenbank.
Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 54 - 59

7.) BRUCKSCHEN, E.: Die Konservierung von Knochengewebe in Cialit- Gewebekonserven.
Hrsg. L. Keßler und H.-J. Seiffling, VEB- Verlag Volk und Grundtest (1961) Berlin

8.) BURIAN, K. und W. CANCURA: Tierexperimentelle Untersuchungen über das Verhalten des Epithels frischer autoplastischer und konservierter homoioplastischer Hauttransplantate im Hinblick auf die Entstehung von Lappencholesteatomen.
Z. Laryng. Rhinol. 38 (1959) 577 - 584

9.) CHRISTIANSEN, T. and A. HOHMANN: The effects of preservation methods on homologous incus transplants in cats.
Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 80 (Jan - Feb 1975) 60 - 70

10.) DATI, G.: Histologische Untersuchungen an Homoiotransplantaten des Incus.
Inaug. Diss. (1971) Tübingen

11.) EVERSHEIM, W., J. HELMS und E. STEINBACH: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Verträglichkeit von Cialit im Gewebe.
Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 199 (1971) 759 - 762

12.) FALKENTHAL, H.: Klinische Ergebnisse homologer Transplantate in der Mittelohrchirurgie.
Inaug. Diss. (1971) Tübingen

13.) GRÜTER, H.: Desinfektionsversuche mit einem neuen Quecksilberpräparat "Cialit". Inaug. Diss. (1933) Münster, Westfalen

14.) GÜNTZ, E.: Über eine einfache Methode der Knochenkonservierung. Langenbeck Arch. klin. Chir. 279 (1954) 56

15.) GÜNTZ, E.: Erfahrungen mit der Knochenbank. Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 51 - 53

16.) GROSS, R. und P. SCHÖLMERICH: Lehrbuch der inneren Medizin. F. K. Schattauer Verlag (1973) 3. Auflage

17.) HABS, H. und H. SEELIGER: Bakteriologisches Taschenbuch. J. A. Barth Verlag (1967) 38. Aufl. München

18.) HACKETHAL, K.-H.: Erfahrungen mit der Knochenbank. Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 59 - 66

19.) HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie. G. Thieme Verlag (1961) 3. Auflage Stuttgart

20.) HAUBERG, G. und E. BRUCKSCHEN: Über eine einfache Methode der Knochenkonservierung. Chirurg 25 (1954) 249 - 252

21.) HELMS, J.: Austritt von Konservierungsmitteln aus konservierten Geweben. Effusionsmessungen nach Konservierung mit Cialit und Merthiolat. H N O 20 (1972) 271 - 273

22.) HELMS, J., H. HILDMANN und E. STEINBACH: Cialitkonservierung von Gehörknöchelchen zur Tympanoplastik; Amboßinterposition bei Paukenfibrose. Tagungsbericht in H N O 23 (1975) 364

23.) HILDMANN, H. und E. STEINBACH: Experimentelle Untersuchungen zur Verträglichkeit von Faszientransplantaten. Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 196 (1970) 133 - 136
und:
Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 198 (1971) 285 - 292

24.) HILDMANN, H., E. KOBURG und E. STEINBACH: Über das Schicksal Cialitkonservierter Homoiotransplantate im Mittelohr. Autoradiographische Untersuchungen an Faszie und Knochen. Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 202 (1972) 666 - 670

25.) HILDMANN, H., E. STEINBACH und E. KOBURG: Das Schicksal von Knochentransplantaten im Mittelohr. Eine autoradiographische Studie bei Kaninchen. Z. Laryng. (London) 88 (1974) 531 - 537

26.) HOEGEN, K.: Histologische Untersuchungen an Knochentransplantaten. Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 66 - 69

27.) HOUSE, W.-F., M.E. PATTERSON and F.M. LINTHICUM: Incus homografts in chronic ear surgery. Arch. Otolaryng. 84 (1966) 148 - 153

28.) JÄGER, M.: Homologe Bindegewebstransplantation. Aktuelle Orthopädie, Heft 2, Thieme Verlag (1970) Stuttgart

29.) JAWETZ, E., J.L. MELNICK und E.A. ADELBERG: Medizinische Mikrobiologie. Springer Verlag (1973) Berlin 3. Auflage

30.) KASTENBAUER, E. und K. HOCHSTRASSER: Von dem Einfluß des Konservierungsmittels Cialit auf die Proteinlöslichkeit und die Antigenität von allogenen und xenogenen Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantaten. Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 203 (1973) 225 - 231

31.) KAUFFMANN, F.: Enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard Publisher Copenhagen (1951)

32.) KAUFFMANN, F.: The bacteriology of enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard Publisher Copenhagen (1966)

33.) KHAN, N.A. und W. SCHWAB: Zur Anwendbarkeit des Homoioamboß bei der Tympanoplastik. H N O 21 (1973) 273 - 276

34.) LANGNICKEL, R.: Modellversuche zur Transplantabilität von Knorpel. II) Der Vergleich von 2 quecksilberhaltigen Konservierungsmitteln. Z. Laryng. Rhinol. 51 (1972) 125 - 133

35.) LENTZ, W.: Der biologische Wert homoioplastischer Knochentransplantate. Langenbeck Arch. klin. Chir. 279 (1954) 52

36.) LERCH, H.: Erfahrungen mit Cialitkonservierten Knochenspänen. Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 83

37.) LERCH, H.: Die Konservierung von Kalbsknochen in Cialit und Thiocid. Chirurg 28 (1957) 309

38.) MAATZ, R.: Die Knochentransplantationen.
Verh. Dtsch. Orthop. Ges. 43. Kongr. Beil. Z. Orthop. 87 (1956) 44 - 51

39.) MARQUET, J.: Reconstructive mikro-surgery of the eardrum by means of a tympanic membrane homograft.
Acta Otolaryng. 62 (1966) 459 - 464

40.) MARQUET, J.: Myringoplasty by eardrum transplantation.
The Laryngoscope (St. Louis) 78 (1968) 1329 - 1332

41.) MARQUET, J.: Homografts in surgery of the ear.
Acta Oto-rhino-laryng. belg. 28 (1974) 629 - 634

42.) MARQUET, J., P. SCHEPENS and W. KUIJPERS: Experiences with tympanic transplants.
Arch. Otolaryng. 97 (1973) 58 - 66

43.) MARQUET, J., K.J. VAN CAMP, W. DECRAEMER and W.L. CRETEN: Some physikal considerations in the choice of technique for ossiculoplasty.
Audiology 14 (1975) 84 - 92

44.) NOVOTNY, Z.: Influence of microbial flora on functional results of tympanoplasty in the tropical areas.
Csl. Otolaryng. 23 (1974) 92 - 95 mit engl. Zus.

45.) PLESTER, D.: Fortschritte in der Mikrochirurgie des Ohres in den letzten 10 Jahren.
H N O (Berlin) 18 (1970) 33 - 40

46.) PLESTER, D.: Tympanic membrane homografts in ear surgery.
Acta Oto-rhino-laryng. belg. 24 (1970) 34 - 37

47.) PLESTER, D.: Homologe Transplantate im Mittelohr.
Laryng. Rhinol. Otol. 54 (1974) 191 - 195

48.) PLESTER, D.: Transplantationen im Mittelohr.
H N O (Berlin) 22 (1974) 258 - 260

49.) PLESTER, D.: Persönliche Mitteilungen in HNO- Kolleg (1975/76) Tübingen

50.) PSCHYREMBEL, W.: Klinisches Wörterbuch
W. de Gruyter Verlag (1972) 251. Aufl. Berlin

51.) SAEGESSER, M.: Spezielle chirurgische Therapie.
H. Huber Verlag (1972) 9. Aufl. Stuttgart

52.) SCHMELZLE, R.: Die Verwendung homologer Gewebekonserven im Kiefer- Gesichtsbereich.
Habil. Schr. Tübingen (1974) 102 - 103

53.) SKERMAN, B.-D.: A guide to the identifikation of the genera of bacteria.
Williams and Wilkens Comp., Baltimore (1967) 2. Auflage

54.) SMITH, G.W. and S.B. OVERTON: The fate of middle ear ossicle grafts.
The Laryngoscope (St. Louis) 78 (1968) 1002 - 1010

55.) STEINBACH, E. und G. WEBER: Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten von homoioplastischen, in Cialit konservierten Gehörknöchelchen nach Implantation im Mittelohr des Meerschweinchens und des Menschen.
Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 196 (1970) 130 - 133

56.) WIESMANN, E.: Medizinische Mikrobiologie.
G. Thieme Verlag (1974) 3. Aufl. Stuttgart

57.) WULLSTEIN, H.: Die Tympanoplastik als gehörverbessernde Operation bei Otitis media chronica und ihre Resultate.
Proceedings des V. Intern. Kongr. Oto- rhinolaryng. Amsterdam (1953) 104
zitiert von PLESTER, D. in H N O 18 (1970) 33 - 40

58.) WULLSTEIN, H.: Operationen zur Verbesserung des Gehörs. Grundlagen und Methoden.
G. Thieme Verlag (1968) Stuttgart

59.) YANNOULIS, G.E.: Vergleichende Resultate bezüglich der Erhaltung der Transplantate (Trommelfell, Gehörknöchelchen) in Cialit und in Unterkühlung mit Biotherapeutika.
Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 199 (1971) 741 - 742

60.) ZÖLLNER, F.: Hörverbessernde Operationen bei entzündlich bedingten Mittelohrveränderungen.
Arch. klin. exp. Ohr., Nas. u. Kehlk. Heilk. 171 (1957) 1 - 62

Für die entgegenkommende Überlassung des Themas, die freundliche und tatkräftige Hilfe sowie für seine wertvollen Anregungen sei an dieser Stelle Herrn Professor Dr. D. Plester sehr herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. R.-E. Bader, dem Leiter des Hygiene- Instituts an der Universität Tübingen, für seine wohlwollende Unterstützung bei der Planung und Ausführung meiner Untersuchungen und für die großzügige Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Fräulein R. Storz sei ebenfalls für die ständige Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen gedankt.

Schließlich gilt mein Dank auch Herrn Dr. M. Przerwa und Herrn L. Bischoff, die mir bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials bereitwillige Hilfe leisteten.

Außerdem möchte ich nicht versäumen, meiner Mutter, Frau E. Berger, für ihre Hilfe bei der Durchsicht und beim Schreiben dieser Arbeit zu danken.

Lebenslauf

Am 9. März 1950 wurde ich, Thomas F. Berger, als zweites Kind des Stadtdirektors der Stadt Stuttgart Dr. jur. Karl- Heinz Berger und seiner Ehefrau Esther, geb. Benzinger in Stuttgart geboren.

Ich bin evangelisch und besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.
Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Kräherwald- Grundschule, anschließend das humanistische Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart, an dessen neusprachlichem Zweig ich am 21. 6. 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Universität Tübingen das Studium der Chemie. Nachdem ich für das Wintersemester 1971/72 einen Studienplatz in Tübingen erhalten hatte, wechselte ich auf das Fach Humanmedizin über.

Im September 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im März 1974 die ärztliche Vorprüfung ab.

Das klinische Studium der Medizin begann ich allerdings erst im Wintersemester 1974/75, da ich wegen Krankheit mein Studium für ein Semester unterbrechen mußte.

Am 29. 8. 1975 legte ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Frühjahr 1976 begann ich mit der Arbeit an meiner Dissertation.

Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich am 26. 8. 1977 und den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 16. 10. 1978 ab.